

ヒト歯根膜細胞による石灰化ノジュール形成におけるレチノイン酸の抑制作用

著者	渋谷 夏子
号	32
学位授与番号	412
URL	http://hdl.handle.net/10097/36581

氏 名 (本籍) : 渋 谷 夏 子

学 位 の 種 類 : 博 士 (歯 学) 学 位 記 番 号 : 歯 博 第 4 1 2 号

学位授与年月日 : 平成19年3月27日 学位授与の要件 : 学位規則第4条第1項該当

研究科・専攻 : 東北大学大学院歯学研究科(博士課程) 歯科学専攻

学位論文題目 : ヒト歯根膜細胞による石灰化ノジュール形成におけるレチノイン酸の抑制作用

論文審査委員 : (主査) 教授 島 内 英 俊

教授 笹 野 泰 之 教授 鈴 木 治

論 文 内 容 要 旨

レチノイン酸 (RA) はビタミンAの活性代謝物で、レチノールからレチナールを経て生じ、生体内において様々な組織の成長、分化および恒常性維持などに対して影響を及ぼすことが知られている。RA は、再生医学研究の領域において胚性幹細胞から心筋や肺胞細胞などの選択的分化誘導などに応用されているが、歯周組織の再生を担う歯根膜細胞 (PDL) の分化に対してどのような影響を及ぼすかについてはほとんど報告がなかった。そこで本研究では、RA が PDL の分化に及ぼす影響とその作用機構を明らかにすることを目的として、同細胞の *in vitro* における石灰化ノジュール形成を指標として検討を行った。

PDL はインフォームドコンセントを得た健常者の第3大臼歯抜歯時に採取した歯根膜組織より overgrowth させて、4~7代継代培養したものを本実験に供試した。また RA として all-trans RA (ATRA) 及びその異性体である 9-cis-RA あるいは 13-cis-RA を用いた。また PDL による硬組織形成は、コンフルエントとなった同細胞を石灰化誘導培地で培養することにより石灰化ノジュールを形成させ、Von Kossa 染色を行い検出した。まず ATRA を PDL 培養中に添加すると RA の濃度依存的に石灰化が阻害され、RA 濃度 $1\mu\text{M}$ 以上では完全に抑制されることが明らかとなった。またこの抑制効果は他の異性体、9-cis-RA 及び 13-cis-RA でもほぼ同様に認められた。石灰化誘導開始から最初の4日間のみ ATRA を存在させた場合でも石灰化が完全に抑制されたが、培養後期に RA を存在させるとその抑制効果が減少したことから、RA は PDL の分化時期に依存して石灰化を抑制することが示唆された。PDL における RA 受容体 (RAR) を明らかにするために種々の選択的アゴニストを用いて調べたところ、RAR- α に対するアゴニスト (AM-580) は PDL の石灰化ノジュール形成を抑制したが、レチノイドX受容体 (RXR) に対するアゴニスト (メトプレノ) では抑制されなかった。また RT-PCR にて同受容体 mRNA 発現を解析したところ、RAR- α , β , γ 及び RXR のうち RXR- β のみが PDL に発現していることが確認され、同細胞における RA の作用発現に RAR が主に関与す

ることが示唆された。また、PDLにおける石灰化の抑制にはアルカリフォスファターゼ（ALP）活性の抑制も伴っていることが明らかとなった。PDLにおいて石灰化ノジュール形成に関与することが知られている PDGF 受容体（PDGFR）- α 、PDGFR- β および EGF 受容体（EGFR）の発現は、RA を添加しても変化がみられなかった。以上の結果から、RA は PDL において RAR- α と結合することにより、同細胞の分化に対して負の調節作用を及ぼすことが示された。

審 査 結 果 要 旨

レチノイン酸（RA）はビタミンAの活性代謝物で、レチノールからレチナールを経て生じ、生体内において様々な組織の成長、分化および恒常性維持などに対して影響を及ぼすことが知られている。RA は、再生医学研究の領域において胚性幹細胞から心筋や肺胞細胞などの選択的分化誘導などに応用されているが、歯周組織の再生を担う歯根膜細胞（PDL）の分化に対してどのような影響を及ぼすかについてはほとんど報告がなかった。本研究は、RA が PDL の分化に及ぼす影響とその作用機構を明らかにすることを目的として、同細胞の *in vitro* における石灰化ノジュール形成を指標として検討を行ったものである。

本研究の結果、以下に示す知見を得ている。すなわち、1) *all-trans* RA (ATRA) を PDL 培養中に添加すると RA の濃度依存的に石灰化が阻害され、RA 濃度 $1\mu\text{M}$ 以上では完全に抑制されることが明らかとなった。またこの抑制効果は他の異性体、9-*cis*-RA 及び 13-*cis*-RA でもほぼ同様に認められた。2) 石灰化誘導開始から最初の4日間のみ ATRA を存在させた場合でも石灰化が完全に抑制されたが、培養後期に RA を存在させるとその抑制効果が減少した。3) PDL における RA 受容体（RAR）に対する選択的アゴニストを用いて調べたところ、RAR- α に対するアゴニスト（AM-580）は PDL の石灰化ノジュール形成を抑制したが、レチノイド X 受容体（RXR）に対するアゴニスト（メトプレノ）では抑制されなかった。また RT-PCR により RAR- α 、 β 、 γ 及び RXR のうち RXR- β のみが PDL に発現していることが確認され、同細胞における RA の作用発現に RAR が主に関与することが示唆された。4) PDL における石灰化の抑制にはアルカリフォスファターゼ（ALP）活性の抑制を伴うが、PDGF 受容体（PDGFR）- α 、PDGFR- β および EGF 受容体（EGFR）の発現は変化がみられなかった。

以上の結果から、RA は PDL において RAR- α と結合することにより、同細胞の分化に対して負の調節作用を及ぼすことが明らかとなった。加えて RA による石灰化抑制は PDL の分化時期に依存するものであることも示唆された。

以上示した通り、渋谷夏子君の研究は歯周組織の再生に重要とされる PDL に対する RA の新たな作用を明らかにしたもので、歯周組織再生研究の発展に有用な情報を提供するものである。従って、当審査委員会は博士（歯学）を授与するに相応しい業績と判定した。